

mRNA differential display를 이용한 철에 의해 조절되는 유전자들의 분리 및 동정

이중림 · 박종환 · 김해영*

경희대학교 산업대학 식품가공학과 및 유전공학연구소

초 록 : 철은 사람에게 필수적인 영양소일 뿐 아니라 해로운 요소로도 작용한다. 이러한 철에 의해 진핵생물체에서 발현이 조절되는 유전자들을 밝히기 위해 철이 첨가되거나, 제거된 조건에서 배양된 HeLa 세포로부터 RNA differential display 방법을 이용하여 발현 또는 억제되는 유전자들을 선별하였다. 모두 24개의 유전자가 선별되었으며, 염기배열 확인과 northern blot의 발현 확인과정을 거쳐 4개의 유전자들이 철에 의해 영향을 받는 것으로 확인되었다.(1999년 3월 25일 접수, 1999년 4월 17일)

서 론

진핵생물의 철의 흡수과정 및 조절과정은 siderophore를 이용하는 박테리아와 세포표면의 reductase를 이용하는 효모를 포함한 하등생물과는 전혀 다른 기작으로 작용되고 있다.^{1,2)} 진핵생물에서는 plasma transferrin이 세포내의 철과 결합하여 철의 용해성을 갖게 한 후, 세포표면의 transferrin receptor에 의해 인식된 후, 세포내로 흡입되어 이용하게 되며, 세포내의 철의 농도는 철 흡수의 조절로 유지된다.³⁾ 이와 같이 흡수된 철은 철을 함유하고 있는 단백질 및 효소인 hemoglobin, myoglobin, cytochrome 계열의 단백질, iron-sulfur 단백질들, iron enzymes, 락토펜린 등에 중요한 요소로 작용하고 있다. 그러한 유전자들의 조절에 대한 발현과정 및 철의 관련 기작 들은 post-transcriptional 단계에서의 철 저장 단백질인 ferritin, Krebs 회로의 aconitase, transferrin 수용체인 transferrin receptor, heme의 생합성에 관여하는 erythroid 5-aminolevulinatase 등 일부만이 밝혀져 있고, 많은 철을 포함한 단백질들에 비해 철과의 직접적인 조절에 대한 연구보고는 제한적이다.^{4,9)} 따라서 철에 의해 발현이 조절되는 관련 유전자들을 밝히기 위한 연구가 필요하였다.

최근에 전사단계에서 외부 인자에 의한 유전자발현의 차이를 밝힐 수 있는 기술인 Representational difference analysis (RDA), Enzymatic degradation subtraction, Linker capture subtraction, Subtractive hybridization, mRNA differential display 방법 등⁷⁾이 보고되었다. 이러한 다양한 실험방법들은 자기 단점을 갖고 있는데 그 가운데 subtraction을 이용한 방법들은 많은 양의 시료가 필요하고, hybridization에 의한 방법은 비교구의 오차범위가 크며, 기술적으로 실험하기 어려운 단점이 보고되었다.⁸⁾ 이러한 방법 가운데 RNA

differential display 분석방법⁹⁾은 세포 또는 조직에서 분리한 RNA로부터 mRNA의 3' polyA의 antisense인 polyT를 포함한 primer를 이용하여 reverse transcription을 거친 후, 5'→3' 방향의 arbitrary primer와 polyT primer를 사용하여 polymerase chain reaction 증폭과정을 거쳐 발현정도가 다른 유전자들을 밝히는 기술로 많은 연구^{10,12)}가 진행되었다.

본 연구에서는 이러한 RNA differential display 방법을 이용하여 세포배양시 철의 공급원으로 ferric ammonium citrate를 첨가하거나, 세포배양시 철을 제거시킬 수 있는 chelator로서의 desferrioxamine¹⁴⁾를 처리하여 철의 유무에 따라 발현 또는 억제되는 유전자들을 분리하고, 동정하였다.

실험 재료 및 방법

세포배양 조건

미국 국립 보건원에서 분양 받은 monolayer 성장형태의 HeLa cell을 CO₂ 배양기에서 5% fetal bovine serum, 1X streptomycin, 1X glutamine이 포함된 변형된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지(Gibco-BRL, USA)에서 두 번의 계대를 통하여 활성화시킨 후, 세포의 영양 상태를 매 12시간마다 현미경에서 확인한 다음, 실험재료로 사용하였다. Ferric ammonium citrate(FAC) (Sigma)와 desferrioxamine(Dfo) (Sigma)는 사용 전 제조하여 100 μM 농도로 세포에 각각 처리한 후, 16시간 더 배양하여 상등액 배지는 제거하고, 세포들을 cell scraper를 사용하여 모아 시료로 사용하였다. 대조구로는 FAC, Dfo를 처리하지 않은 같은 배양 조건의 세포를 사용하였다.

RNA 추출 및 확인

선택된 세포들은 RNazol(Gibco-BRL)을 사용하여 상온에서 5분간 반응시켜, 세포를 용해시킨 후, chloroform을 사용하여 상온에서 5분간 반응시켜 세포단백질을 변성시키고, 4°C의 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등 액을

찾는말 : RNA differential display, 철, desferrioxamine, ferric ammonium citrate

*연락처

모은 후, isopropyl alcohol을 넣어 상온에서 15분간 반응시켜, total RNA들을 침전시켰다. 침전된 RNA는 75% 에탄올을 이용하여 염을 제거한 후, 건조시켰다. 준비된 total RNA는 1% formamide-agarose의 RNA gel로부터 18S ribosomal RNA 와 28S ribosomal RNA band를 확인하여 추출된 RNA가 RNase에 의해 오염되지 않은 완전한 것임을 확인하였다. 또한, UV-spectrophotometer의 260 nm의 파장을 이용하여 준비된 RNA를 정량하였다.¹⁹ 배양된 10 ml 세포당 10 µg정도의 total RNA가 추출되었으며, 추출된 RNA는 -70°C의 초저온 냉동고에 보관하여 반복된 실험에 사용하였다.

Reverse transcription

추출된 RNA들은 Table 1에서 예시된 3종류의 oligo-dT primer 각각을 20 µM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP의 dNTP 혼합물, MMLV reverse transcriptase(Gibco-BRL), diethyl pyrocarbonate(DEPC) (Sigma)가 처리된 물, reverse transcriptase 반응 완충용액과 함께 0.5 ml tube에 준비하였다. 준비된 반응물은 thermocycler(Model, PTC-100) (MJ Research, USA)을 사용하여, 65°C에서 5분간, 37°C에서 1시간, 75°C에서 5분간 반응을 수행하여 reverse transcription과 효소 불활성화 반응을 수행하였다. 반응물은 95°C에서 5분간 반응으로 RNA와 DNA의 분리과정을 거친 후, cDNA로 사용하였다.

Polymerase chain reaction

앞서 reverse transcription으로부터 준비된 cDNA, PCR 완충용액, 2 mM dNTP, Table 1에서의 예시한 8개의 염기로 구성된 각각의 arbitrary primer, α-[³⁵S]dATP(Amersham), Taq polymerase(Perkin-Elmer)를 PCR에 사용하였다.

반응조건은 thermocycler에서 94°C에서 30초, 40°C에서 2분간, 72°C에서 40초간 40회 반복으로 PCR을 수행하였다. Arbitrary primer(Table 1)들은 GeneHunter(USA)사에서 G+C 함량이 50%로 임의의 염기배열로 제작된 primer 8개를 사용하여 각 primer당 결과의 신빙성을 높이기 위해 duplicate로 같은 조건으로 동시에 사용하였다. 반응이 끝난 반응물은 전기영동전 까지 4°C에서 보관하고, 나머지는 -20°C에서 보관하였다.

Table 1. Arbitrary Primers used for RNA Differential display

Class	Primer name	Primer sequence
5'→3' direction	H-T11G	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'
	H-T11A	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'
	H-T11C	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'
3'→5' direction	H-AP1	5'-AAGCTTGATTGCC-3'
	H-AP2	5'-AAGCTTCGACTGT-3'
	H-AP3	5'-AAGCTTTGGTCAG-3'
	H-AP4	5'-AAGCTTCTCAACG-3'
	H-AP5	5'-AAGCTTAGTAGGC-3'
	H-AP6	5'-AAGCTTGCACCAT-3'
	H-AP7	5'-AAGCTTAACGAGG-3'
	H-AP8	5'-AAGCTTTTACCGC-3'

전기영동 및 cDNA의 재증폭

PCR로부터 증폭된 시료들은 염기배열분석 실험과 같은 1x TBE 완충용액을 사용하여 urea와 6%의 polyacrylamide가 포함된 젤을 이용하여 철이 처리된 시료와 비교 구를 1500 volts에서 3시간 전기영동 실험을 수행하였다. 전기영동후 3M 여지에 젤을 옮긴 후, 플라스틱 wrap으로 씌운 뒤 Bio-Imaging analyzer의 카세트 박스에 넣은 후, Bio-Imaging analyzer(Fuji, Japan)에서 band를 비교하여, 동위원소에 표지된 양을 측정하였다. Bio-Imaging analyzer에서 젤을 분리하여 vacuum dryer에서 건조시킨 후, 카세트에 필름과 함께 넣어 analyzer에서 측정된 양에 따라 3~4일간 보관한 후, 인화된 필름으로부터 발현된 유전자들을 선택하였다. Fig. 1에 실험 방법을 간단하게 설명하였다.

선택된 유전자는 gel로부터 면도칼을 이용하여 분리한 후, 수용액에서 15분간 가열, 추출한 후, sodium acetate와 100% 에탄올, 20 µg의 glycogen을 사용하여 -70°C에서 1시간동안 침전시켰다. 침전된 유전자는 85% 에탄올로 염을 제거한 후, 재증폭하기 위하여 PCR에서 사용한 같은 종류의 primer를 이용하였다.

Northern blot

대조구와 처리구의 세포로부터 추출한 total RNA 10 µg를 formaldehyde agarose gel에서 분류한 후, GeneScreen Plus membrane(DuPont)에 옮긴 후, hybridization 용액과 함께

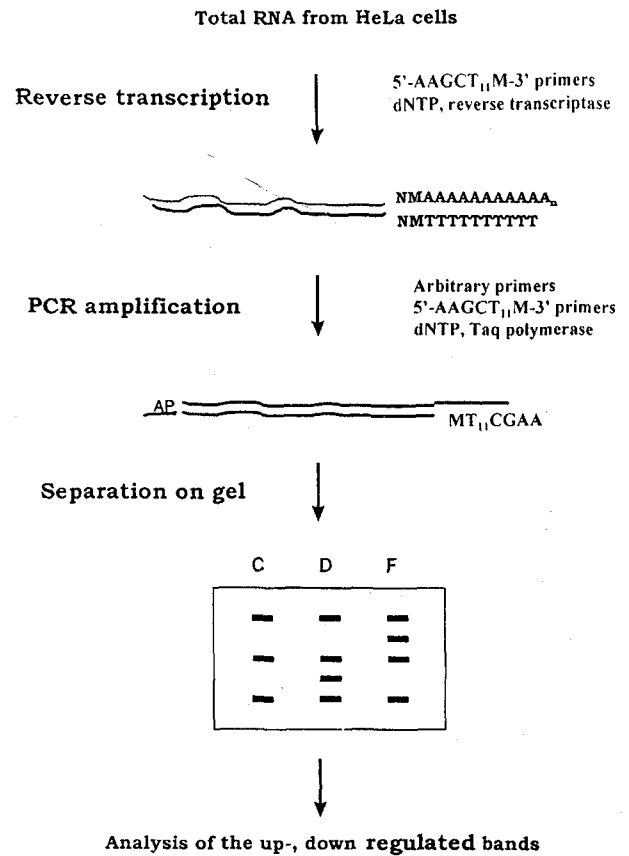


Fig. 1. Schematic representation of RNA differential display.

42°C에서 4시간동안 prehybridization을 수행하였다. Probe로 사용할 재증폭된 cDNA는 [³²P]dCTP(50 µCi, Amersham, USA), random primer, DNA polymerase를 이용하여 표지한 후, 10⁶ cpm/ml 농도로 hybridization bottle에 prehybridization된 membrane과 같이 넣은 후, 42°C에서 12시간 동안 hybridization을 수행하였다.

Hybridization을 마친 membrane은 2x SSC 완충용액으로 상온에서 15분간 세척한 후, 2% SDS가 포함된 2x SSC 완충용액으로 60°C에서 3회 세척을 더 수행하였다. 세척을 마친 membrane은 Bio-Imaging analyzer와 Lightening-Plus intensifying screen(Kodak, USA)을 사용한 X-ray 필름을 이용하여 결과를 확인하였다.

또한, 세포에 처리된 FAC와 Dfo의 효과가 실험에 이용된 동량의 total RNA를 확인하기 위해 northern blot의 대조구로 transferrin receptor(TfR)와 β-actin의 probe를 사용하였다. TfR cDNA probe는 TfR amplification primer set(Clontech, USA)를 이용하여 1.35 kb cDNA를 얻었으며, β-actin cDNA은 유전자가 포함된 pHHC189 plasmid로부터 1.1 kb의 EcoRI 절편을 분리 추출하여 사용하였다.

염기 배열 확인 및 유전자 검색

Northern blot의 결과로부터 발현의 차이를 보인 cDNA는 TA-cloning vector (Invitrogen, USA)로 subclone 시켜 plasmid isolation kit(Qiagen, USA)를 사용하여 plasmid를 분리하였다.

분리된 plasmid들은 대조구 plasmid와 크기 차이로 선별하고, 농업과학 기기 센터에서 보유하고있는 ABI automatic sequencer(Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 염기배열 분석반응을 시킨 후, 염기배열을 확인하였다.

확인된 염기배열은 Genbank의 데이터베이스에서 Blast 프로그램¹⁶⁾을 이용하여 유사성을 검색한 후, 이미 알려진 유전자들의 유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

cDNA의 재증폭으로부터 발현이 조절된 유전자들의 선별

Dfo, FAC가 각각 처리된 처리구와 대조구로부터 준비된 세포의 RNA를 RT-PCR로부터 얻은 2배수의 시료들은 전기영동 실험으로 분석하였다. 대조구와 처리구와 비교하여 발현이 증가된 유전자는 13개, 억제된 유전자는 11개가 선별한 후, 젤로부터 분리하였다. Fig. 2는 전기영동에서 대조구와 비교되어 특이하게 발현된 유전자들의 결과들의 예이다.

선택된 유전자들은 앞서 사용한 PCR 반응으로부터 증폭시킨 후, agarose gel을 이용한 전기영동으로부터 증폭된 것을 확인하였다. 24개의 시료 가운데 20개만이 증폭되었으며, 증폭된 유전자는 gel로부터 gel-extraction kit(Qiagen)를 사용하여 추출한 후, PCR-cloning vector(Invitrogen)로 subcloning하였다. 모두 15개의 유전자들이 cloning vector에 옮겨져 northern blot과 염기배열 분석에 사용하였다.

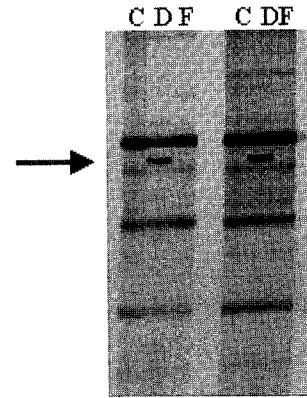


Fig. 2. Differential genes expression in HeLa cells using arbitrary primers. Duplicated RNA samples were used for each primers. RNAs were prepared from HeLa cells untreated (C) or treated with desferrioxamine (D) or with ferric ammonium citrate (F).

Northern blot에 의한 actin과 transferrin receptor 유전자 발현 확인

동량의 10 µg의 total RNA를 사용한 northern blot이 다른 실험 오차 없이 수행했는지를 확인하기 위해 β-actin을 발현정도를 측정하였다. FAC, Dfo를 처리한 각 RNA 시료들과 아무 처리되지 않은 대조구에서 β-actin의 발현은 동일한 정도로 발현된 것이 측정되었으며, 본 northern blot 실험에서 사용된 RNA의 시료가 동량 사용되었음을 보여주고 있다(Fig. 3B).

또한, 본 실험에서 처리된 Dfo와 FAC의 세포에 대한 효과적인 작용을 확인하기 위해 actin에서 사용한 같은 조건의 RNA에 transferrin receptor의 probe를 사용하여 발현정도를 측정하였다(Fig. 3A). 대조구에 비해 FAC 처리구에서는 발현정도가 억제되었으며, Dfo 처리구에서는 발현이 활성화되어 대조구에 비해 높은 발현정도가 측정되었다.

이러한 결과는 transferrin receptor(TfR)에서 이미 보고된 결과¹⁷⁾로 FAC에 의해 세포 내에 철이온의 농도가 높아지면, iron regulatory protein인 철 농도 조절 단백질이 불활성화되어 TfR의 3-untranslated region(UTR)에 결합되지 못하여 TfR의 RNA stability가 떨어져 결국 TfR의 RNA가 분해

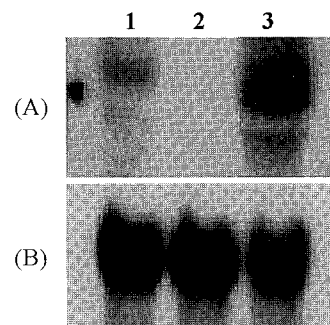


Fig. 3. Northern blot hybridization analysis of transferrin receptor (A) and β-actin (B) in HeLa cell. HeLa cells were either untreated (1) or treated with ferric ammonium citrate (2) or desferrioxamine (3).

되어 TfR의 RNA의 발현이 되지 않으며, 철의 농도가 부족한 Dfo 처리 구에서는 철 농도 조절 단백질이 활성화되고, 이러한 단백질이 TfR의 3'UTR에 결합되어 TfR RNA의 안정성이 높아져 TfR의 RNA가 높게 발현되어 TfR이 철을 운반하는 역할을 하게된다. Fig. 3(A)의 실험결과로부터 세포배양에 FAC와 Dfo의 농도가 적정하게 사용되어 철에 관계된 유전자들을 유도시킬 수 있음을 보여주었다.

Northern blot 확인에 의해 발현된 유전자들

PCR 산물이 cloning된 vector로 subclone된 20개의 유전자는 HindIII 제한효소를 이용하여 자른 후, 추출하여 Northern blot의 probe로 사용하였다. 추출된 probe는 random labeling kit(Amersham) 방법에 따라 [³²P]dCTP, random primer, DNA polymerase를 이용하여 표지한 후, G-25 resin을 이용하여 표지된 probe를 순수 분리 또는 분리 단계 없이 그대로 사용하였다. Prehybridization과 hybridization은 표지된 probe와 reverse transcription에 사용한 같은 조건의 RNA를 10 µg 사용하여 수행한 후, Bio-Imaging analyzer와 X-ray film을 이용하여 결과를 관찰하였다. 모두 15개의 유전자를 northern blot 실험을 수행하였으며, 이 가운데 6개만이 결과를 확인할 수 있었다.

Fig. 4에서 FAC, Fig. 5에서 Dfo에 의해 발현된 유전자들을 보여주고 있다. Northern blot으로 결과를 확인할 수 없는 유전자들은 세포에서 발현정도가 낮기 때문에 total RNA에서 발현을 확인할 수 없는 것으로 추측된다. Northern blot에서 확인된 유전자들은 Bio-Imaging Analyzer의 정량으로부터 3개의 유전자가 대조구와 비교하여 2배에서 10배정도의 발현의 차이가 측정되었으며, 나머지 3개의 유전자에서는 유의성 있는 발현의 차이가 측정되지 않았다. 이와 같이 RNA differential display를 이용한 실험결과는 실험조건에 따라 다르게 발현된 유전자들을 동정할 수 있는 방법이지만, RNA differential display에 의해 gel상에서 다르게 발현

된 유전자들의 pattern이 northern blot에서 재연성의 문제가 개선해야 할 과제로 다른 연구자들에 의해서도 보고되고 있다.^{18,19)}

철에 의해 발현된 유전자들의 동정

Northern blot으로 발현이 확인된 유전자들은 plasmid로 재조합된 후, 자동염기서열장치를 이용하여 염기배열을 분석하였다. 확인된 염기배열은 Genbank의 데이터베이스에서 NCBI의 Blast search 프로그램을 이용하여 검색한 후, 이미 알려진 유전자들과의 일치성과 유사성을 확인하였다. FAC의 처리에 의해 발현된 유전자들의 염기배열 정보들로부터 유전자 검색방법에 의해 확인된 발현이 저해된 ATP synthase(EMBL databank # X60221) (Fig. 4B), 발현이 증가된 NADH dehydrogenase(EMBL databank # X68647)(Fig. 4C), 발현의 차이를 보이지 않은 Fig. 4A는 보고되지 않은 유전자로 밝혀졌다. 또한, Dfo에 의해 발현되고 유전정보가 확인된 유전자들 가운데 발현이 증가된 Fig. 5A는 지금까지 보고된 유전자와 완전히 일치하는 하지 않았으나, Genbank # D12644인 쥐의 KIF2 단백질과 60%정도의 유사성을 보였다. 또한, 발현의 차이를 보이지 않은 유전자들은 각각 pre-mRNA splicing factor(Genbank databank # L04636) (Fig. 5B), homocysteine 관련 유전자인 RTP(Genbank databank # D87953) (Fig. 5C) 등으로 밝혀졌다. 발현 조절이 확인된 유전자들 가운데 NADH dehydrogenase는 NADH로부터 산소까지의 전자 전달계에 관여하는 첫 번째 효소로 NADH-Q reductase 또는 Complex I로도 알려졌으며, 특히 단백질 내에 prosthetic group에 Fe-S 형태가 존재하는 효소로서 철의 영향에 대한 직접적으로 발현이 조절되는 것으로 사려되며, 그 외 다른 밝혀진 유전자들도 철에 의해 직접, 간접적으로 발현이 조절되는 것으로 추측할 수 있으며, 앞으로 이에 대한 지속적인 연구가 더 필요하다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 지원의 농업과학기술센터(NICEM)의 농업과학 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Lewin, R. (1984) How micro-organism transport iron. *Science*, **225**, 401.
- Ymaguchi-Iwai, Y. R., Stearman, R., Dancis, A. and Klausner, R. D. (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulation in yeast. *EMBO J.* **15**, 3377-3384.
- Emmery, T. (1982) Iron metabolism in humans and plants. *Amer. Sci.* **70**, 626-628.
- Klausner, R. D., Rouault, T. A. and Harford, J. B. (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell*, **72**, 19-28.
- Kim, H. Y., LaVaute, T., Iwai, K., Klausner, R. D. and

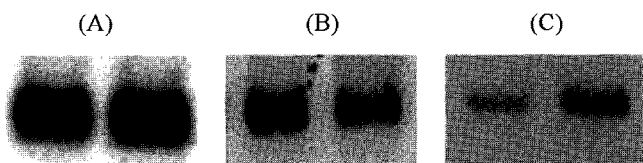


Fig. 4. Northern blot hybridization analysis of genes in ferric ammonium citrate-treated HeLa cell. HeLa cells were either left untreated or treated with ferric ammonium citrate. (A) Unknown gene; (B) ATP synthase; (C) NADH dehydrogenase.

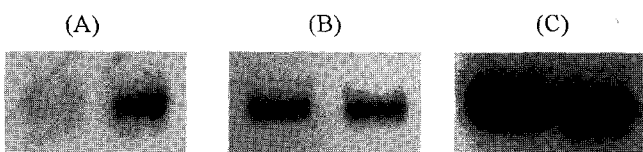


Fig. 5. Northern blot hybridization analysis of genes in desferrioxamine-treated HeLa cell. HeLa cells were either left untreated or treated with desferrioxamine. (A) Unknown gene; (B) pre-mRNA splicing factor; (C) RTP

- Rouault, T. A. (1996) Identification of a conserved and functional iron-responsive element in the 5'-untranslated region of mammalian mitochondrial aconitase. *J. Biol. Chem.* **271**, 24226-24230.
6. Cox, T. C., Bawden, M. J., Martin, A. and May, B. K. (1991) Human erythroid 5-aminolevulinic synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. *EMBO J.* **10**, 1891-1902.
7. O'Neill, M. J. and Sinclair, A. H. (1997) Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2681-2682.
8. Watson, J. B. and Margulies, J. E. (1993) Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. *Develop. Neurosci.* **15**, 77-86.
9. Liang, P. and Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* **257**, 967-971.
10. Watson, M. A. and Fleming, T. P. (1994) Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res.* **54**, 4598-4602.
11. Zhang, L. and Medina, D. (1993) Gene expression screening for specific genes associated with mouse mammary tumor development. *Mol. Carcinog.* **8**, 123-126.
12. Liang, P. and Pardee, A. B. (1995) Recent advances in differential display. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 274-280.
13. Brown D. (1981) Gene expression in eukaryotes. *Science* **211**, 667-674.
14. Singh, S., Hider, R. C. and Porter, J. B. (1990) Separation and identification of desferrioxamine and its iron chelating metabolites by high-performance liquid chromatography and fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **187**, 212-216.
15. Kim, H. Y., Klausner, R. D. and Rouault, T. A. (1995) Translational repressor activity is equivalent and is quantitatively predicted by *in vitro* RNA binding for IRP1 and IRP2. *J. Biol. Chem.* **270**, 4983-4986.
16. Benson, D., Lipman, D. J. and Ostell, J. (1993) GenBank database. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2963-2965.
17. Koeller, D. M., Casey, J. L., Hentze, E. M., Chan, L.-N. L., Klausner, R. D., and Harford, J. B. (1989) A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 3574-3578.
18. Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E. and Chalifour, L. (1994) Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **199**, 564-569.
19. Wan, J. S. and Erlander, M. G. (1997) Cloning differentially expressed genes by using differential display and subtractive hybridization. *Methods Mol. Biol.* **85**, 45-68.

Isolation and Identification of Genes Regulated by Iron Using mRNA Differential Display

Jung-lim Lee, Jong-Hwan Park and Hae-Yeong Kim*(Dept. of Food Science and Institute of Genetic Engineering, College of Industry, Kyunghee University, Suwon 449-701, Korea)

Abstract : Iron is an essential nutrient but potentially toxic element in human. To identify the effects of iron on the gene expression of mammalian cell, we have isolated several genes that are regulated by iron using the RNA differential display method. RNAs were isolated from HeLa cells treated with iron supplement or iron chelator. A total of 24 genes were isolated and of these, four genes were identified by DNA sequencing and northern blot.

Key words : RNA differential display, iron, desferrioxamine, ferric ammonium citrate

*Corresponding author